

6

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-123392

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 P 19/26  
19/04

識別記号

庁内整理番号  
8515-4B  
A-8515-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月27日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ヒアルロン酸の製造方法

⑮ 特 願 昭61-269734

⑯ 出 願 昭61(1986)11月14日

|         |                              |     |                                      |
|---------|------------------------------|-----|--------------------------------------|
| ⑰ 発 明 者 | 橋 本                          | 正 道 | 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社<br>中央研究所内 |
| ⑰ 発 明 者 | 三 枝                          | 治 久 | 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社<br>中央研究所内 |
| ⑰ 発 明 者 | 千 葉                          | 晋   | 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社<br>中央研究所内 |
| ⑰ 発 明 者 | 北 川                          | 広 進 | 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社<br>中央研究所内 |
| ⑰ 発 明 者 | 三 好                          | 照 三 | 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社<br>中央研究所内 |
| ⑰ 出 願 人 | 電気化学工業株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号 |     |                                      |

明 細 書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とする醗酵法によるヒアルロン酸の製造法。
- (2) 菌株の増殖しない表1に示す培地成分から成る人工合成培地に生育できる栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒアルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とする醗酵法によるヒアルロン酸の製造法。

一、故

| 寄地成分        | 寄地成分   |
|-------------|--|
| グルコース       | アデニン   |
| L-アラニン      | グアニン   |
| L-アルギニン     | ウラシル   |
| L-アスパラギン    | D, L-パントテン酸カルシウム   |
| L-アスパラギン酸   | リボフラビン   |
| L-シスチイン     | チアミン   |
| L-グルタミン     | ナイアシン  |
| L-グルタミン酸    | ピリドキサミン  |
| グリシン        | ピリドキサール  |
| L-ヒスチジン     | 葉酸   |
| L-ヒドロキシプロリン | ピオチン   |
| L-イソロイシン    | パラアミノ安息香酸  |
| L-ロイシン      | NAD  |
| L-リジン       | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                    |
| L-メチオニン     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                    |
| L-フェニルアラニン  | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                               |
| L-プロリン      | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                               |
| L-セリン       | MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                               |
| L-スレオニン     | NaCl   |
| L-トリプトファン   | NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O* |
| L-チロシン      | NaHCO <sub>3</sub>   |
| L-バリン       | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                               |

◆ 酢酸ソーダ

### 3. 発明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本発明は、醗酵法によるヒアルロン酸の製造法に関する。さらに詳しくは、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキスを培養し、ヒアルロン酸を生成蓄積せしめることを特徴とするヒアルロン酸の製造法に関する。

〔従来の技術〕

従来ヒアルロン酸はニワトリのトサカ、牛の眼の硝子体又は腸管等より抽出によつて得られていた。しかしながら抽出法によるヒアルロン酸製造は、分離精製が非常に困難等の欠点を有していた。

その欠点を改良するために、ヒアルロン酸を生産する能力を有する微生物を培養し、その培養液から直接ヒアルロン酸を採取する方法が開示されている（特開昭58-56692号公報、特開昭61-63294号公報）。

さらに、微生物を増殖し、ヒアルロン酸を採取する方法について、培養のロットごと生成量を安定化させるため、突然変異株を用いる方法が暗示

されている（特開昭61-219394号公報）。

本発明者らは、ヒアルロン酸産生能を有するストレプトコッカス属の微生物を、培養液のpH 7.5～9.0にコントロールすることにより、高分子量のヒアルロン酸を生成蓄積せしめる方法についてすでに提案した（特願昭61-170943号明細書）。

〔発明が解決しようとする問題点〕

微生物を培養して、ヒアルロン酸の生産を行なうと、ロットごとの生産量が不安定であり、工業的に実施する際に、大きな問題となる。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、かかる問題を解決すべく、種々研究を行なつた結果、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキが意外にも規模よりも、高収量で、しかも収量のバラツキが少なく安定にヒアルロン酸を生成することを見出し本発明を完成するに至つた。

すなわち本発明は、栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキを培養し、ヒア

ルロン酸を生成物としてしめることを特徴とする酸酵法によるヒアルロン酸の製造法である。

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明の栄養要求性が部分的に解除されたストレプトコッカス・エキは、ヒアルロン酸生成能を有するストレプトコッカス・エキの突然変異株の中から収得することが出来る。

例えば、ストレプトコッカス・エキ ATCC9527を用い、ポリペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、グルコース2%の培地にて、33℃で培養し、対数増殖期の菌を、低温で遠心分離により集菌し、生理食塩水を用いて、無菌的に3回洗浄する。N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン50mg/mlを含むpH5.0、0.05Mリン酸緩衝液中、30℃で1時間振盪したのち、水冷する。ついで、生理食塩水を用いて、低温で菌体を3回洗浄した後、ポリペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、グルコース2%の培地で、33℃、3時間培養し、また生理食塩水を用いて、低温で菌体を3回洗浄する。表2に示す人工合成培地で、

33℃、7日間液体培養し、増殖してきた培養液をさらに、新しい同じ人工合成培地にうえつぎ、この操作を3回くりかえす。

次に寒天を含む同じ組成の培地上に塗布し、コロニーを分離し、ストレプトコッカス・エキFM100を得る。

本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に、醸工研菌寄第9027号として受託されている。ストレプトコッカスFM100は、部分的に栄養要求性が解除され、親株であるATCC9527が生育できない表2に示す培地成分だけからなる人工合成培地によく生育することができる。

表 2

| 培地成分        | 濃度(%) | 培地成分   | 濃度(%)  |
|-------------|-------|--|--------|
| グルコース       | 10000 | D, L-パントチン酸カルシウム   | 0.5    |
| L-アラニン      | 200   | リゾアラニン   | 0.5    |
| L-アルギニン     | 200   | チアミン   | 0.5    |
| L-アスパラギン    | 200   | ナイアシン  | 1.0    |
| L-アスパラギン酸   | 200   | ピリドキサミン  | 1.0    |
| L-システイン     | 100   | ピリドキサール  | 1.0    |
| L-グルタミン     | 350   | 葉酸   | 0.005  |
| L-グルタミン酸    | 1000  | ピオチン   | 0.0025 |
| グリシン        | 400   | パラアミノ安息香酸  | 0.1    |
| L-ヒスチジン     | 400   | NAD  | 0.5    |
| L-ヒドロキシプロリン | 50    | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 500    |
| L-イソロイシン    | 200   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 14000  |
| L-ロイシン      | 200   | MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                                       | 200    |
| L-リジン       | 200   | FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                                       | 10     |
| L-メチオニン     | 200   | MnSO <sub>4</sub> ・4H <sub>2</sub> O                                       | 10     |
| L-フェニルアラニン  | 200   | NaCl   | 10     |
| L-プロリン      | 200   | NaC <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub> ・3H <sub>2</sub> O(酢酸ソーダ) | 10000  |
| L-セリン       | 200   | N <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>  | 500    |
| L-スレオニン     | 200   | CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O                         | 60     |
| L-トリプトファン   | 200   |  |        |
| L-チロシン      | 200   |  |        |
| L-バリン       | 200   |  |        |
| アラニン        | 20    |  |        |
| グアニン        | 20    |  |        |
| ウラシル        | 20    |  |        |

ストレプトコッカス・エキFM-100の栄養要求性は表3に示すとおりである。

表 3

| 栄養素       | 要求性 | 栄養素        | 要求性 | 栄養素            | 要求性 |
|-----------|-----|------------|-----|----------------|-----|
| レ-アラニン    | なし  | レ-メチオニン    | あり  | DL-ヒスチジン酸カルシウム | あり  |
| レ-アルギニン   | あり  | レ-フェニルアラニン | あり  | リボフラビン         | あり  |
| レ-アスパラギン酸 | なし  | レ-プロリン     | なし  | チアミン           | あり  |
| レ-シスチニン   | あり  | レ-セリン      | なし  | ナイアシン          | なし  |
| レ-グルタミン   | あり  | レ-スレオニン    | あり  | ピリドキサミン        | なし  |
| レ-グルタミン酸  | なし  | レ-チロシン     | あり  | ピリドキサール        | あり  |
| グリシン      | なし  | レ-トリプトファン  | あり  | 葉酸             | なし  |
| レ-ヒスチジン   | あり  | レ-バリン      | あり  | ピオチン           | あり  |
| レ-イソロイジン  | あり  |            |     | パラアミノ安息香酸      | なし  |
| レ-ロイジン    | あり  | アデニン       | あり  | NAD            | あり  |
| レ-リジン     | あり  | ウラン        | なし  |                |     |

特定の栄養素の要求性が解除された菌株を取得するときは、表2の培地から、その栄養素を除いた培地を作成し、上述と同様の操作を行なう。

また栄養要求性が部分的に解除された菌株は、とくに人為的に変異処理を行なわなくても、上述のようなうえつぎ操作をくりかえすことにより獲得することもある。

本発明に用いる培地は通常の微生物の培養に用いるもので良く、グルコース、フラクトース、ガラクトース、シユクロース、等の炭素源、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、亜硫酸ソーダ、チオ硫酸ソーダ、リン酸アンモニウム等の無機塩類、ポリペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、コーンステープリカー、大豆加水分解液等の有機栄養源の他、必要に応じて各種アミノ酸、ビタミン類等が好適に用いられる。

これらの培地成分は一括仕込又は分割添加いずれでも採用可能である。

本発明の培養は、通気・攪拌培養等の公知の方法

法でよく、培養温度は30〜35℃が好ましい。

培養液のpHは、菌の生育と共に低下するため、カセソーダ、カセカリ、アンモニア等のpH調整剤を添加し、pH 6.5〜7.0にコントロールする。

このようにして培養すると、ヒアルロン酸の生成と共に、培養液の粘度が次第に上昇してくる。使用炭素源が培養液中で消費された時点で培養を停止し、遠心分離による除菌後、アルコール等の有機溶媒による析出、膜外ろ過による脱塩等の簡単な公知精製法により、高収率でヒアルロン酸が得られる。

#### 〔実施例〕

次に実施例により、本発明を詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例1

グルコース2%、リン酸第1カリウム0.2%、硫酸マグネシウム7水塩0.05%、チオ硫酸ソーダ0.1%、ポリペプトン1.0%酵母エキス0.5%からなるpH 8.5の培養液1ℓに同一培地からなるストレプトコッカス・エキFM-100の前培養

表 3

| パッチ数 | 収量g (培養液1Lあたり) |
|------|----------------|
| 1    | 7.2            |
| 2    | 7.1            |
| 3    | 7.0            |
| 4    | 7.3            |
| 5    | 7.1            |

液10Lを接種し、通気量1.5vvm、攪拌200回転/分、温度33℃でカビソーダでpHを8.5にコントロールしながら培養し、15時間後に、グルコース2%を分添し、グルコースが全部消費された時点で培養を停止した。

培養液を塩酸でpH4に調整後、蒸留水で2倍希釈し、遠心分離により除菌した。得られた除菌液をエチルアルコールを加え、ヒアルロン酸ソーダを析出せしめる。これをろ別した後、水に溶解し、セチルピリジニウムクロライドを加え、生じた沈殿をろ取し、2%食塩水に再溶解後、再びエチルアルコールによる析出をくり返す。得られたヒアルロン酸ソーダを室温で減圧乾燥して、培養液1Lあたり7.2gの白色ヒアルロン酸ソーダを得た。

得られたヒアルロン酸ソーダは、赤外線吸収スペクトル、C-13核磁気共鳴スペクトル、ストレプトミセスのヒアルロニダーゼによる分解実験でヒアルロン酸ソーダであることが確認された。

上記と同様の培養を4回くりかえし、全部で5パッチ行なった結果を表3に示す。

さらに長期的に培養を行なったが、ヒアルロン酸収量は常に安定していた。

#### 比較例1

菌株であるストレプトコッカス・エキアTCC 9527を実施例1と同様にして、5回くりかえしたが、得られたヒアルロン酸ソーダはそれぞれ、4.5g、2.3g、3.5g、1.2g、3.9gであり、収量は実施例1に比較して、低く、またばらついていた。

#### 〔発明の効果〕

本発明によれば、ヒアルロン酸を高収率で、しかも収量にばらつきなく、安定に生産することが

できる。また菌体管理も容易である。

本発明によつて製造されたヒアルロン酸は、化粧品、医薬品に配合して使用できる。

特許出願人 電気化学工業株式会社